

論文審査および最終試験結果報告書

論文提出者氏名：岩崎 美樹

論文題目：ゼブラフィッシュ鱗の形態形成機構に関する研究

審査の概要：

骨の形態の多様性に関係する骨の3次元構造の形成機構は、哺乳類では細胞の動態を生体内で観察することが難しいために明らかでない。一方、魚類では、膜性骨（鱗、鰓蓋骨、鰭条骨）が透明な表皮の直下に存在することから、ゼブラフィッシュ green fluorescent protein (GFP) トランスジェニック系統の解析で鰓蓋骨と鰭条骨の骨芽細胞の動態が観察されている。すなわち、鰭条骨では特定の表皮細胞がソニック・ヘッジホッグ a (*shha*) を発現し、分裂中の骨芽細胞を局在させて鰭条骨の分岐を制御する。一方、鰓蓋骨では特定の骨芽細胞がインディアン・ヘッジホッグ a (*ihha*) を発現して隣接する骨芽前駆細胞の分裂を制御し、鰓蓋骨を一定方向に伸長させる。本研究では、未解明のままとなっている鱗の形態形成機構を、種々のゼブラフィッシュ・トランスジェニック系統を用いて細胞生物学的および分子生物学的に解析した。

第一章では、ゼブラフィッシュ通常鱗で GFP を発現するトランスジェニック系統 (*gSalzGFFM848:gal4;UAS:GFP, sp7p:GFP-caax*) を観察した。その結果、鱗には2種類の骨芽細胞、(i) 骨基質の内側表面の1層の扁平な central cell と、(ii) 鱗の後縁部の成長点に沿って細長く伸長した marginal cell が存在した。また、鱗の成長に伴い central cell 数は増加せずに細胞のサイズが増大し、marginal cell は細長く変化することを明らかにした。次に、鱗の除去後に生じた再生鱗の実験から、鱗の再生前に既に分裂を終えた骨芽前駆細胞が存在し、この細胞が鱗の除去を引き金に骨芽細胞に分化することを示した。この再生鱗を対象にシクロパミン処理による Hh シグナル阻害実験を行い、*shha* は細胞分化に必要であることを示した。さらに、Wnt/PCP シグナル受容体 (Frizzled class receptor 3a, Fzd3a) の細胞内ドメインを除去した変異タンパク質 (dnFzd3a) を表皮特異的に発現させる実験で、(i) Wnt/PCP シグナルが *shha* 表皮発現パターンを制御すること、(ii) 表皮分泌 Shha が骨芽前駆細胞に働いて marginal cell を分化させて鱗を一定方向に伸長させることを示した。

第二章では、側線鱗の中央部にある半円筒形の管器骨や、管器骨内腔の感覚器（感丘）のゼブラフィッシュの成長に伴う変化を観察した。その結果、側線鱗の形態形成過程では骨形成と骨吸収による骨リモデリングが生じていると考えられた。そこで、GFP トランスジェニック系統 (*SAGFF (LF)228A:gal4;UAS:GFP, CathepsinK (ctsk):GFP*)





を用いて、管器骨の骨基質の両面に central cell や marginal cell とは異なる形態の骨芽細胞が局在していることをみつけた。一方、感丘の周辺領域には多核の破骨細胞が存在し、その近傍には骨吸収を示すハウシツプ窩がみられた。次に、マクロファージコロニー刺激因子受容体 (*c-fms*) のゼブラフィッシュ突然変異体 (*c-fms/panther*) の側線鱗を観察したところ、管器骨の形成に異常を示し、管器内径と感丘サイズは小さくなったが、通常鱗の形成には異常がなかった。これらの結果は、通常鱗の後縁部における骨の成長には破骨細胞は関与しないが、管器骨の形成および成長には破骨細胞が必要で、管器骨形成では骨リモデリングが生じていると考えられた。さらに、側線鱗の再生や、側線鱗を除去した場所に通常鱗を移植する実験の結果から、骨リモデリングによる管器骨の形成は、感丘組織によって制御されていることが明らかになった。

以上、本研究により鱗の形態形成には、特定の領域に骨芽細胞や破骨細胞が局在することが必要であることが示された。また、これら細胞の分化や局在には周辺組織からの作用が不可欠であることを明らかにした。さらに、鱗の再生の際には、分裂を終えた骨芽前駆細胞が、鱗の除去を引き金にして骨芽細胞に分化することを示した。また、鱗の成長は、骨芽細胞の増殖を伴わず、骨芽細胞のサイズが大きくなることによっで行われていることを明らかにした。本研究で得られた結果は、骨の形態の違いを生み出す発生機構の解明に大きく寄与するもので、博士論文にふさわしいものと判断できる。

また、2018 (平成 30) 年 7 月 4 日に実施した最終試験において、論文の内容ならびに関連分野について、本人が学位を受けるのに必要十分な学識ならびに学力を持つことを認め、合格と判定した。

以上の結果から、審査員一同はこれを北里大学・博士 (水産学) の学位を授与するのに値するものと判定した。

論文審査担当者：

主 査	北里大学	教授	佐藤 繁	
副 査	北里大学	教授	菅野信弘	
	東京大学	准教授	木下滋晴	
	北里大学	准教授	池田大介	
	北里大学	特任教授	渡部終五	